

Оригинальные исследования

© ЛАПЕШИН П.В., САВЧЕНКО А.А., ДЫХНО Ю.А., МОСКОВСКИХ М.Н., МАРКОВА Е.В. -

ОСОБЕННОСТИ АКТИВНОСТИ НАД- И НАДФ-ЗАВИСИМЫХ ДЕГИДРОГЕНАЗ В КЛЕТКАХ ЛЕГОЧНОЙ ТКАНИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЛЕГКОГО В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА GSTM1

П.В. Лапешин, А.А. Савченко, Ю.А. Дыхно, М.Н. Московских, Е.В. Маркова.

(Красноярская государственная медицинская академия, ректор - д.м.н. проф. В.И. Прохоренков; ГУ НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН, директор - проф. В.Т. Манчук; Красноярский государственный университет, ректор - д.ф.-м.н. проф. А.С. Проворов)

Резюме. С целью изучения особенностей активности НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ в клетках здоровой и опухолевой ткани у больных раком легкого в зависимости от полиморфизма гена GSTM1 обследовано 30 больных мужского пола с раком легкого. Активность дегидрогеназ определяли билюминесцентным методом. Анализ генетического полиморфизма GSTM1 гена проводили методом ПЦР. Установлено, что метаболизм здоровой ткани легкого при генотипе GSTM1 0/0 характеризуется повышенным уровнем ряда пластических процессов с синтезом НАДФН и высокой активностью глутатионредуктазы (ГР), а также снижением активности анаэробных реакций при повышении интенсивности субстратного потока по циклу трикарбоновых кислот. В опухолевой ткани при генотипе GSTM1 0/0 при сниженной активности ГР выявляется повышение интенсивности анаэробных процессов.

Ключевые слова: рак легкого, опухолевая ткань легкого, метаболизм, активность дегидрогеназ, глутатионредуктаза, полиморфизм гена

В настоящее время рак легкого занимает ведущее место в структуре онкологической заболеваемости. [4]. Рост заболеваемости раком легкого связывают не только с улучшением диагностики и общим старением населения, но и с повышением степени загрязнения окружающей среды и генетическими факторами [5,9]. Среди генетических факторов наибольшее значение имеют протоонкогены, а также гены "предрасположенности" [8]. Многими исследованиями показано, что полиморфизм гена GSTM1 (глутатион-Б-трансферазы M1) - фермента биотрансформации ксенобиотиков служит фактором риска развития рака легкого [2,11,15,16]. Такие данные получены в том числе и для жителей г. Красноярск [6]. При так называемом "нулевом генотипе" GSTM1 (GSTM1 0/0) снижается эффективность глутатион-зависимой системы биотрансформации, что повышает патогенность влияния вредных факторов окружающей среды (в том числе и курения) на легочную ткань и, соответственно, повышает вероятность развития рака легкого [1].

Значительный интерес представляет фенотипическое проявление полиморфизма гена GSTM1 на уровне клеточного метаболизма в здоровой и опухолевой тканях. Связано это с тем, что система катаболизма ксенобиотиков с одной стороны использует субстратные и энергетические ресурсы клетки, с другой стороны, осуществляя биотрансформацию ксенобиотиков, защищает метаболическую систему от воздействия патогенных факторов [10,11,12]. В связи с этим, целью исследования явилось изучение активности НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ в клетках здоровой и опухолевой ткани у больных раком легкого в зависимости от полиморфизма гена GSTM1.

В качестве показателей внутриклеточного метаболизма выбраны НАД(Ф)-зависимые дегидрогеназы в связи с тем, что, во-первых, основными переносчиками электронов в клетках являются пиридиновые нуклеотиды, а отсюда - активное участие оксидоредуктаз в биоэнергетических процессах; во-вторых, НАД(Ф)-зависимые дегидрогеназы, участвуя в направленной координации сопряженных метаболических потоков, в значительной степени обуславливают адаптивные изменения клеточного обмена веществ [3,13,14].

Материалы и методы

На базе торакального отделения Красноярского краевого онкологического центра обследовано 30 больных мужского пола с раком легкого. Ткань легкого забиралась во время операции. Определение активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в опухолевой и здоровой ткани легкого проводили билюминесцентным методом [7]. Данным методом определялась активность следующих ферментов: глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ), НАД- и НАДН-зависимой реакции лактатдегидрогеназы (ЛДГ и Обр.ЛДГ), НАД- и НАДН-зависимой реакции малатдегидрогеназы (МДГ и Обр.МДГ), НАДФ- и НАДФН-зависимой глутаматдегидрогеназы (НАДФГДГ и Обр.НАДФГДГ), НАД- и НАДН-зависимой глутаматдегидрогеназы (НАДГДГ и Обр.НАДГДГ), НАД- и НАДФ-зависимых изоцитратдегидрогеназ (НАДИЦДГ и НАДФИЦДГ) и глутатионредуктазы (ГР). Активность дегидрогеназ выражали в ферментативных единицах (1 Е=1 мкмоль/мин [3]) на мг белка ткани.

Анализ генетического полиморфизма GSTM1 гена проводили методом мультиплексной ПЦР. Для этого ДНК выделяли из цельной крови. В качестве контроля реакции использовали амплифи-

кацию CYP1A1 гена [6]. Результат выявляли электрофоретически в 3%-ном агарозном геле с добавлением бромистого этидия и визуализировали на трансиллюминаторе. Гетерозиготное и гомозиготное по нормальному аллелю состояние гена (GSTM1+) определялось присутствием на электрофореграммах фрагмента амплификации размером 271 н.п. (рис.1). Его отсутствие указывало на гомозиготное состояние по делеции данного участка гена (GSTM1 0/0).

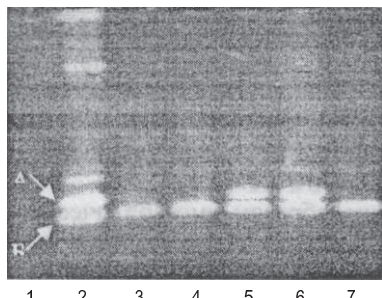


Рис. 1. Идентификация генотипов гена GSTM1 методом ПЦР-анализа в 3% агарозном геле (1 - отрицательный контроль; 2, 5, 6 - генотип GSTM1 (+/+, +/0); 3, 4, 7 - генотип GSTM1 (0/0).

Примечание: А - 271 н.п. (фрагмент GSTM1); Б - 18' н.п. (фрагмент CYP1A1).

Для всех полученных данных определяли среднее арифметическое значение (М) и ошибку средней арифметической (т). Сравнение величин уровней активности дегидрогеназ здоровой ткани и опухолевой ткани легкого осуществляли по критерию Вилкоксона. Проверку гипотезы о статистической достоверности величин исследуемых показателей несвязанных выборок проводили с помощью критерия Манна-Уитни. Исследование силы взаимосвязей между исследуемыми параметрами осуществляли с помощью корреляционного анализа.

Результаты и обсуждение

При исследовании особенностей уровней активности НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ в здоровой и опухолевой ткани легкого у больных раком легкого с различным генотипом в отношении гена GSTM1 обнаружено, что в клетках здоровой ткани при "нулевом генотипе" статистически достоверно повышены уровни Г6ФДГ, НАДФМДГ и ГР (рис.2). Кроме того, в клетках здоровой ткани при GSTM1 0/0 значительно снижены уровни активности Обр.ЛДГ (при GSTM1+ - $11,34 \pm 2,19$ мкЕ/мг белка; при GSTM1 0/0 - $0,01 \pm 0,001$ мкЕ/мг белка; $P < 0,01$) и Обр.МДГ (при GSTM1+ - $106,18 \pm 21,71$ мкЕ/мг белка; при GSTM1 0/0 - $19,64 \pm 4,41$ мкЕ/мг белка; $P < 0,05$), но при повышении активности МДГ (при GSTM1+ - $49,61 \pm 12,36$ мкЕ/мг белка; при GSTM1 0/0 - $1363,99 \pm 205,54$ мкЕ/мг белка; $P < 0,01$) и НАДИЦДГ (при GSTM1+ - $6,18 \pm 2,11$ мкЕ/мг белка; при GSTM1 0/0 - $36,93 \pm 12,07$ мкЕ/мг белка; $P < 0,05$).

В клетках опухолевой ткани у больных раком легкого с генотипом GSTM1 0/0 по сравнению с показателями больных с генотипом GSTM1+ зна-

чительно снижена активность ГР (рис.2), но повышены уровни Обр.ЛДГ (при GSTM1+ - $0,01 \pm 0,001$ мкЕ/мг белка; при GSTM1 0/0 - $42,51 \pm 10,48$ мкЕ/мг белка; $P < 0,001$) и Обр.МДГ (при GSTM1+ - $2,36 \pm 0,41$ мкЕ/мг белка; при GSTM1 0/0 - $130,63 \pm 25,69$ мкЕ/мг белка; $P < 0,05$).

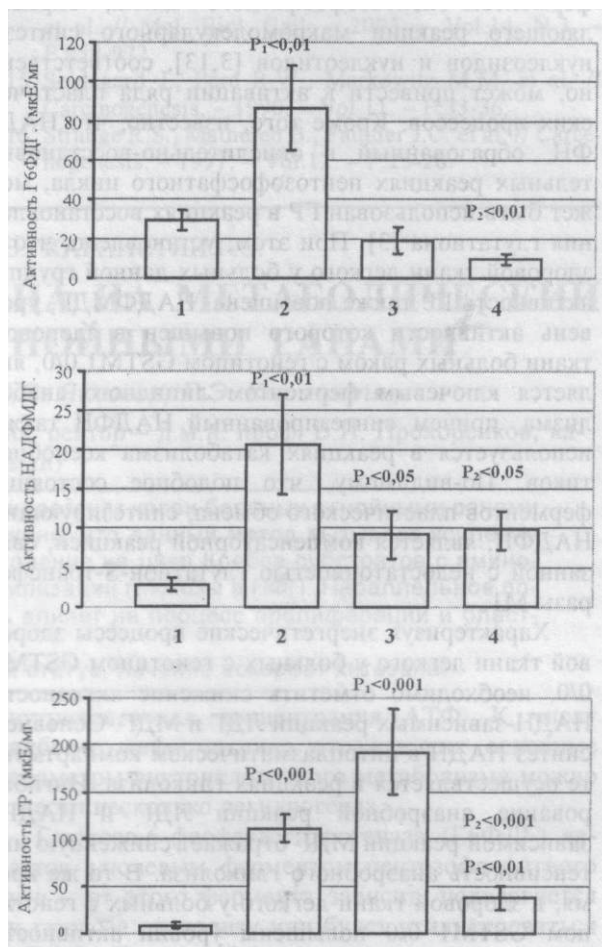


Рис.2. Активность Г6ФДГ, НАДФМДГ и ГР в клетках здоровой и опухолевой ткани легкого у больных раком легкого с генотипами GSTM1+ и GSTM1 0/0.

Примечание: 1 - Активность ферментов в клетках здоровой ткани при генотипе GSTM1+; 2 - Активность ферментов в клетках здоровой ткани при генотипе GSTM1 0/0; 3 - Активность ферментов в клетках опухолевой ткани при генотипе GSTM1+; 4 - Активность ферментов в клетках опухолевой ткани при генотипе GSTM1 0/0.

При сравнительном исследовании уровней активности оксидоредуктаз в здоровой и опухолевой ткани легкого в зависимости от GSTM1-генотипа установлено, что у больных с генотипом GSTM1+ в клетках опухолевой ткани по сравнению с клетками здоровой ткани увеличена активность НАДФМДГ и ГР (рис.2), но снижены уровни Обр.ЛДГ ($P < 0,01$) и Обр.МДГ ($P < 0,01$). В то же время у больных с генотипом GSTM1 0/0 в клетках опухолевой ткани по сравнению с клетками здоровой ткани снижена активность Г6ФДГ, НАДФМДГ, ГР (рис.2) и МДГ ($P < 0,01$), но при повышении уровней Обр. ЛДГ ($P < 0,01$) и Обр. МДГ ($P < 0,05$).

Исследуемые ферменты находятся на разных метаболических путях и преимущественно характеризуют пластические и энергетические реакции. Так, повышение активности Г6ФДГ в здоровой ткани легкого у больных с генотипом GSTM1 0/0, которая является ключевым и инициализирующим ферментом пентозофосфатного цикла, определяющего реакции макромолекулярного синтеза нуклеозидов и нуклеотидов [3,13]. соответственно, может привести к активации ряда пластических процессов. Кроме того, известно, что НАДФН, образованный в окислительно-восстановительных реакциях пентозофосфатного цикла, может быть использован ГР в реакциях восстановления глутатиона [3]. При этом, установлено, что в здоровой ткани легкого у больных данной группы активность ГР также повышена. НАДФМДГ. уровень активности которого повышен в здоровой ткани больных раком с генотипом GSTM1 0/0, является ключевым ферментом липидного анаболизма. причем синтезированный НАДФН также используется в реакциях катаболизма ксенобиотиков. По-видимому, что подобное состояние ферментов пластического обмена, синтезирующих НАДФН. является компенсаторной реакцией, связанной с недостаточностью глутатион-Б-трансферазы M1.

Характеризуя энергетические процессы здоровой ткани легкого у больных с генотипом GSTM1 0/0, необходимо отметить снижение активности НАДН-зависимых реакций ЛДГ и МДГ. Основной синтез НАДН в цитоплазматическом компартменте осуществляется в реакциях гликолиза. Ингибирование анаэробной реакции ЛДГ и НАДН-зависимой реакции МДГ отражает сниженную интенсивность анаэробного гликолиза. В то же время, в здоровой ткани легкого у больных с генотипом GSTM1 0/0 повышены уровни активности МДГ и НАДИЦДГ. что позволяет предположить повышенный субстратный поток по циклу трикарбоновых кислот, который является основным метаболическим циклом в митохондриальном компартменте для реакций аэробного дыхания.

В то же время, в опухолевой ткани уровни активности исследуемых ферментов также значительно различаются в зависимости от полиморфизма гена GSTM1. Так, в опухолевой ткани у больных с генотипом GSTM1 0/0 выявляется снижение ГР по сравнению с выявленным уровнем у больных с генотипом GSTM1+. что отражает ингибирование глутатион-зависимой антиоксидантной системы. Можно предположить, что при недостаточности глутатион-Б-трансферазы M1 в случае развития опухолевого процесса происходит полный сбой системы обмена глутатиона. Кроме того, повышение активности анаэробной реакции ЛДГ и НАДН-зависимой реакции МДГ характеризует повышенный уровень анаэробных процессов в опухолевой ткани у больных с генотипом GSTM1 0/0.

Таким образом, метаболические процессы в здоровой и опухолевой ткани легкого у больных раком легкого значительно различаются в зависимости от генотипа GSTM1. Причем, для ряда метаболических процессов в здоровой и опухолевой ткани выявляются противоположные изменения. Так. метаболизм здоровой ткани легкого при генотипе GSTM1 0/0 характеризуется повышенным уровнем ряда пластических процессов с синтезом НАДФН и высокой активностью ГР. Со стороны энергетических процессов обнаружено выраженное снижение активности анаэробных реакций, при повышении интенсивности субстратного потока по циклу трикарбоновых кислот. В опухолевой ткани при генотипе GSTM1 0/0 при сниженной активности ГР выявляется повышение интенсивности анаэробных процессов. Выявленные особенности ткани легкого как опухолевой, так еще и не подвергшейся морфологическим изменениям позволили выделить те метаболические процессы, которые качественно изменяют их интенсивность при перерождении ткани. С одной стороны полученные данные, характеризуют патогенез опухолевого процесса, с другой, делает данные ферментативных реакций перспективными в качестве цели воздействия при разработке новых

медикоментозных средств.

NAD- AND NADP-DEPENDENT DEHYDROGENASES ACTIVITY IN TUMOR CELLS AND HEALTHY LUNG TISSUE ACCORDING TO GSTM1 GENE POLYMORPHISM

P.V. Lapeshin, A. A. Savchenko, Yu.A. Dvchno. M.N. Moskovskih, E.V. Markova

(Krasnoyarsk State Medical Academy)

30 male patients with lung cancer were examined to study the NAD- and NADP-dependent dehydrogenases activity in tumor and healthy lung tissue according to GSTM1 gene polymorphism. Dehydrogenases activity was tested by bioluminescent method. Genetic polymorphism analysis of GSTM1 gene was determined by polymerase chain reaction. It was revealed, that in patients with GSTM1 0/0 genotype metabolism in healthy lung tissue is characterized with elevated level of plastic processes with NADP synthesis and high Glutathione reductase activity. Activity of anaerobic reactions was decreased, tricarboxylic acids cycle was activated. In tumor lung tissue genotype GSTM1 0/0 is characterized with depressed Glutathione reductase activity and activated anaerobic processes.

Литература

1. Баранов В.С., Баранова Е.В., Иващенко Т.Э., Асеев М.В. Геном человека и гены "предрасположенности". Введение в предиктивную медицину.- СПб.: "Интермедика", 2000. - 271 с.

2. Белогубова Е.В., Того А.В., Кондратьева Т.В и др. // Вopr. онкологии. -2000. -Т.46, №5. -С.549-554.
3. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия. - М.: Медицина, 1998. - 704 с.
4. Двойрин В.В., Трапезников Н.Н. // Вестн. ОНЦ РАМН. - 1996. - №2. - С.3-12.

5. Перельман М. //Врач. -2001. -№9. - С.11-16.
6. Румянцева О.А., Маркова Е.В., Титова Н.М., Лапешин П.В. Полиморфизм генов глутатион-S-трансферазы класса M1 и цитохрома P-450A1 здоровых жителей города Красноярска и больных раком легкого // Депонир. в ВИНТИ, 03.10.2003, №1761-B2003. - 44 с.
7. Савченко А.А., Сунцова Л.Н. // Лаб. дело. - 1989. - №11.-0.23-25.
8. Bilello K.S., Murin S., Mattay R.A. // Clin. Chest. Med. - 2002. - Vol.23, N. 1. - P. 1-25.
9. Hemminki K., Zhang H., Czene K. //Int. J. Cancer. - 2003. - Vol. 105, N.5. - P.692-700.
10. Jefieries H., Coster J., Khalil A. et al. // ANZ J. Surg. -2003. - Vol.73, N.7.-P.517-522.
11. Kiyohara C., Wakai K., Mikami H. et al. // Int. J. Cancer. - 2003. - Vol.107, N.1. -P.139-144.
12. Ma J.Y., Rengasamy A., Frazer D. et al. // Environ. Health Perspect. -2003. - Vol.111, N9. - P. 1215-1221.
13. Matsubara S., Matsubara D., Ishibashi T., Takizawa T. // Eur. J. Histochem. - 2003. - Vol.47, N.2. - P. 173-176.
14. McCammon M.T., Epstein C.B., Przybyla-Zawislak B. et al. // Mol. Biol. Cell. - 2003. - Vol.14, N.3. - P.958-972.
15. Seidegard J., Pero R.W., Markowitz M.M. et al. // Carcinogenesis. - 1990. - Vol.11. - P.33-36.
16. Strange R.S., Mathereo B., Faulder J.C. et al. // Carcinogenesis. - 1991. - Vol.12. -P.25-28.

О ВИННИК Ю.С., ДУНАЕВСКАЯ С.С., ЯКИМОВ С.В., КАРАПЕТЯН Г.Э. -

ВЛИЯНИЕ АСКОРБАТ ХИТОЗАНА НА МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ СТАТУС БОЛЬНЫХ С ГНОЙНЫМИ РАНАМИ

Ю.С. Винник, С.С. Дунаевская, С.В. Якимов, Г.Э. Карапетян.

(Красноярская государственная медицинская академия, ректор - д.м.н. проф. В.И. Прохоренков; кафедра общей хирургии, зав. - д.м.н. проф. М.И. Гульман)

Резюме. Исследованы показатели активности дегидрогеназ крови больных с гнойными ранами на фоне применения аскорбат хитозана. Обнаружено, что данный метод вызывает усиление обменных процессов в клетках. Возрастает поступление на цикл Кребса субстратов с аминокислотного обмена, что приводит к повышению утилизации глюкозы в ПФП. Параллельное повышение активности ГР и Г6ФДГ в свою очередь влияет на процесс пролиферации и бласттрансформации клеток.

Ключевые слова: гнойные раны, метаболический статус, лечение аскорбат хитозана.

В настоящее время во всем мире отмечается возрастание интереса к композитным полимерам из коллагена и хитозана, которые высоко совместимы с тканями, обладают антиоксидантными свойствами.

Хитозан очень близок по структуре к мукополисахаридам клеточных оболочек и внеклеточного вещества различных органов человека (гиалуроновая кислота, хондроитин), является нетоксичным высокомолекулярным аминополисахаридом, способным к биологической деструкции до обычных для организма веществ (N-ацетилглюкозамин или глюкозамин) под действием амилазы и лизоцима. Являясь аналогом мукополисахаридов, проявляет высокий мукоадгезивный эффект, стимулирует макрофаги, активизирует образование цитокинов, подавляет фиброз, хорошо сочетается с альбумином, коллагеном, полисахаридами.

Целью данного исследования явилось изучение влияния аскорбат хитозана на метаболическую активность организма больных с гнойными ранами.

При этом в последние годы появилась тенденция к увеличению частоты затяжных форм инфекции и осложнений, что, как предполагается, связано с ростом в популяциях числа людей с иммунодефицитными состояниями. Одним из перспективных направлений, позволяющих оценивать иммунологическую реактивность организма, является исследование метаболизма клеток цельной крови. Доказано, что у людей с иммунодефицитами снижается активность ряда окислительно-восстановительных ферментов и понижается

внутриклеточная концентрация АТФ. К числу наиболее информативно отражающих основные параметры внутриклеточного метаболизма можно отнести несколько дегидрогеназ.

Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Г6ФДГ) является ключевым ферментом пентозофосфатного пути - от этого фермента зависит, подвергнется ли глюкоза гликолизу или будет утилизироваться в ПФП. Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа достаточно тесно взаимосвязана с ферментами антиоксидантной защиты; например, известно о кофакторной взаимосвязи между Г6ФДГ и глутатион-редуктазы (ГР).

Глицерол-3-фосфатдегидрогеназа (ГЗФДГ) существует в двух формах - цитоплазматической и внутримитохондриальной. В цитоплазме осуществляет взаимосвязь между системой липидного обмена и гликолизом.

Лактатдегидрогеназа (ЛДГ) катализирует реакцию, находящуюся на разветвление анаэробного и аэробного превращения пирувата. В результате аэробной реакции ЛДГ нарабатывается основное количество НАДН.

Две изоцитратдегидрогеназы (НАД- и НАДФ-зависимая ИЦДГ) контролируют метаболизм соответствующего субстрата цикла трикарбоновых кислот. Активность фермента НАДИЦДГ отражает субстратный поток по циклу, обуславливающий поддержание необходимой концентрации НАДН и энергетического потенциала митохондрий.

Два фермента участвуют в реакциях метаболизма малата. НАДМДГ является одним из фер-